

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-056395
 (43)Date of publication of application : 02.03.1999

(51)Int.Cl.

C12Q 1/44
 C12Q 1/26
 C12Q 1/60
 G01N 33/92

(21)Application number : 09-244821

(22)Date of filing : 27.08.1997

(71)Applicant : DAI ICHI PURE CHEM CO LTD
 (72)Inventor : NAKANISHI KAZUO
 NAKAMURA MITSUHIRO
 HINO KOICHI
 MANABE MITSUHISA

(54) DETERMINATION OF CHOLESTEROL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for determining HDL cholesterol, with no need of any pretreatment such as centrifugal separation, efficient and simple in procedure, and applicable to various automatic analyzers.

SOLUTION: This method for determining HDL cholesterol comprises as follows: a surfactant selected from polyoxyethylene alkylene phenyl ethers and polyoxyethylene alkylene phenyl ethers and an enzymatic reagent for determining the aimed cholesterol are added to serum, and the reaction level of the HDL cholesterol in lipoproteins is determined within the period of time of the preferential reaction of the HDL cholesterol with the reagent; furthermore, a substance having effect of hampering the reaction of the cholesterol in serum lipoproteins with the reagent is added.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998.2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-56395

(43) 公開日 平成11年(1999)3月2日

(51) Int. C1. 6	識別記号	F I	
C 1 2 Q	1/44	C 1 2 Q	1/44
	1/26		1/26
	1/60		1/60
G 0 1 N	33/92	G 0 1 N	33/92

B

審査請求	未請求	請求項の数 5	F D	(全 6 頁)
(21) 出願番号	特願平9-244821		(71) 出願人	390037327 第一化学薬品株式会社 東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(22) 出願日	平成9年(1997)8月27日		(72) 発明者	中西 一夫 茨城県竜ヶ崎市向陽台3-3-1 第一化学 薬品株式会社つくば開発研究所内
			(72) 発明者	中村 光浩 茨城県竜ヶ崎市向陽台3-3-1 第一化学 薬品株式会社つくば開発研究所内
			(72) 発明者	日野 浩一 茨城県竜ヶ崎市向陽台3-3-1 第一化学 薬品株式会社つくば開発研究所内
			(74) 代理人	弁理士 小野 信夫
				最終頁に続く

(54) 【発明の名称】コレステロールの定量法

(57) 【要約】

【課題】 遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率よく測定することができ、種々の自動分析装置に適用できるHDL中のコレステロールの定量法を提供すること。

【解決手段】 血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、ならびにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうち、HDL中のコレステロールが優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にそのコレステロールの反応量を測定するHDLコレステロールの定量法および更に血清リポタンパク質中のコレステロールとコレステロール測定用酵素試薬との反応を阻害する効果を有する物質を加えたHDLコレステロールの定量法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、ならびにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうち、高比重リポタンパク質中のコレステロールが優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にそのコレステロールの反応量を測定することを特徴とする高比重リポタンパク質コレステロールの定量法。

【請求項2】 血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、血清リポタンパク質中のコレステロールとコレステロール測定用酵素試薬との反応を阻害する効果を有する物質、ならびにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうち、高比重リポタンパク質中のコレステロールが優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にそのコレステロールの反応量を測定することを特徴とする高比重リポタンパク質コレステロールの定量法。

【請求項3】 血清リポタンパク質中のコレステロールとコレステロール測定用酵素試薬との反応を阻害する効果を有する物質がリポタンパク質を溶解しない界面活性剤又はポリアニオンと2価金属イオンを生成する物質の組み合わせである請求項2記載の高比重リポタンパク質コレステロールの定量法。

【請求項4】 次の成分(イ)および(ロ)、
(イ)ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤
(ロ)コレステロール測定用酵素試薬

を含有する高比重リポ蛋白質コレステロール測定用試薬もしくは試薬キット。

【請求項5】 次の成分(イ)～(ハ)、
(イ)ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤
(ロ)血清リポタンパク質中のコレステロールとコレステロール測定用酵素との反応を阻害する効果を有する物質

(ハ)コレステロール測定用酵素試薬
を含有する高比重リポ蛋白質コレステロール測定用試薬もしくは試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遠心分離などの操作の必要がなく、少ない試料で簡便な操作により効率良く高比重リポタンパク質(HDL)中のコレステロールとHDL以外のリポタンパク質中のコレステロールとを分離

定量する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 コレステロール等の脂質は、血清中においてアボタンパクと結合し、リポタンパク質を形成している。リポタンパク質は物理的な性状の違いにより、カイロミクロン、超低比重リポタンパク(VLDL)、低比重リポタンパク(LDL)、高比重リポタンパク(HDL)等に分類される。これらのリポタンパク質のうち、LDLは動脈硬化を引き起こす原因物質の一つであり、一方HDLは抗動脈硬化作用を示す事が知られている。

【0003】 疫学的には、HDL中のコレステロール値は動脈硬化性疾患の発症頻度と逆相関を示す事が知られており、今日では、虚血性心疾患の予防や診断を目的としてHDL中のコレステロールの測定が広く行われている。HDL中のコレステロールの測定法としては、たとえば超遠心分離によってHDLを、他のリポタンパクと分離した後、コレステロール測定に供する方法や、電気泳動によって分離した後に脂質の染色を行って、その発色強度を測定する方法が知られている。しかしながら、これらの方法は、いずれも、操作が煩雑であったり、多数の検体を処理できないなどの問題があり、日常的にはほとんど用いられていない。

【0004】 現在臨床検査の領域で一般に広く用いられている、HDL中のコレステロールの測定方法は、検体に沈殿剤を加えてHDL以外のリポタンパクを凝集させ、これを遠心分離によって取り除き、分離されたHDLのみを含む上清中のコレステロールを測定する沈殿法である。この方法は、超遠心法や電気泳動法に比較して簡便であるものの、沈殿剤を加えて分離する操作を含むために、比較的多量の検体量を要し、又、分析誤差を生じる可能性も高く、全分析工程を完全に自動化することはできなかった。

【0005】 一方、酵素的にHDL中のコレステロールを分別定量する方法も検討されている。たとえば、胆汁酸塩及び非イオン系界面活性剤の存在下に、酵素反応を行う方法(特開昭63-126498号公報)が知られている。この方法は、反応初期の酵素反応はLDL濃度に比例し、その後HDL中のコレステロール濃度に比例することを利用したものであるが、HDL中のコレステロールと他のリポタンパク質の中のコレステロールの反応を完全に分別することはできず、正確性に問題があった。

【0006】 また、HDL以外のリポタンパク質をあらかじめ凝集させておき、HDL中のコレステロールのみを酵素的に反応させた後に、酵素を失活させると同時に凝集を再溶解して吸光度を測定するという方法(特開平6-242110号)が知られている。しかしながら、この方法は少なくとも3回の試薬を添加する操作が必要であるため、限定された自動分析装置にしか適用でき

す、汎用性の点で問題があった。又、沈殿の再溶解に際しては、高濃度の塩を使う等、分析器機に対するダメージや試薬廃棄の点でも満足できるものではなかった。

【0007】更に、特許第2600065号では、通常の沈殿法に用いられる、HDL以外のリボタンパクを沈殿させる沈殿試薬と一般的なコレステロール測定試薬を組み合わせて使用し、沈殿しないHDL中のコレステロールを測定する方法が開示されるが、沈殿剤の効果によって生じる濁りが測定系に妨害を与え、また、一般的なコレステロール試薬では沈殿するHDL以外のリボタンパク中のコレステロールとも反応してしまうなど、精度の点では不十分な測定法であった。

【0008】

【発明が解決しようとする問題】したがって、本発明の目的は、遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率よく測定することができ、種々の自動分析装置に適用できるHDL中のコレステロールの定量法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者等は血清中のリボタンパク中のコレステロールの測定について種々検討していたところ、リボタンパクを溶解する特定の界面活性剤の存在下で血清とコレステロール測定用酵素試薬との反応を行えば、まず最初にHDLコレステロールのみが反応し、次いでHDLの反応に遅れてVLDL中のコレステロールが反応し、最後にかなり遅れてLDL中のコレステロールが反応することを知った。

【0010】そして、更に研究を行った結果、最初のHDLコレステロール濃度に依存する反応を測定できるよう測定ポイントを適宜選択することにより、HDLコレステロールのみを測定できること、および系内に血清リボタンパク内のコレステロールとコレステロール測定用酵素との反応を阻害する物質を存在せしめることにより、HDLコレステロールの濃度のみに依存した反応を長時間にわたって維持できること、更にこれらの方針は自動分析装置にも適用できることを見出し、本発明を完成した。

【0011】すなわち、本発明は、血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、ならびにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リボタンパク質のうち、HDL中のコレステロールが優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にそのコレステロールの反応量を測定することを特徴とするHDLコレステロールの定量法を提供するものである。

【0012】また、本発明は、上記HDLコレステロールの定量法において、更に血清リボタンパク質中のコレステロールとコレステロール測定用酵素試薬との反応を阻害する効果を有する物質を加えた方法を提供するもの

10

20

30

40

50

である。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明方法で用いられるポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤（以下、「溶解促進性活性剤」という）は、リボタンパク質を溶解する作用を有する界面活性剤である。このうち前者の市販品の例としてはエマルゲンA-60（花王社製）などが、後者の市販品の例としてはエマルゲンB-66（花王社製）等があげられる。かかる界面活性剤は、単独で又は2種以上を組み合わせて用いる事ができる。またその使用量は化合物によって異なり、特に制限されるものではないが、試薬を適用すべき分析装置毎に、望ましい測定時間内にHDLコレステロールが検出できる感度となるよう、実験的に定めることができ、通常は0.01-5重量%の濃度にて使用するのが好ましい。

【0014】また、本発明の測定方法においては、血清リボタンパク質のコレステロールとコレステロール測定用酵素試薬との反応を阻害する効果を有する物質（以下、「反応阻害物質」）の存在下で行うことが好ましく、そうすることにより存在しない場合に比較して、より長時間HDLコレステロールの濃度のみに依存した反応を維持することができる。

【0015】本発明で用いられる反応阻害物質としては、リボタンパク質に結合親和性を示す物質やリボタンパク質を溶解しない界面活性剤が挙げられ、それぞれ単独あるいは複数の物質を組み合わせて用いることができる。

【0016】リボタンパク質に結合親和性を示す物質（以下、「結合性物質」という）の例としては、ポリアニオンと2価金属塩を生成する物質の組み合わせを挙げることができるが、これはHDLとも結合し沈殿を生じるような物質であってもかまわない。具体的なポリアニオンの例としては、デキストララン硫酸、リンタングステン酸、ヘパリン等が、2価金属塩を生成する物質の例としては、MgCl₂、CaCl₂、MnCl₂、NiCl₂等の2価金属の塩化物やこれらの水和物等が挙げられる。これらの結合性物質は、単独で又は2種以上を組み合わせて用いることができ、またその使用量は物質の種類によって異なり、特に限定されるものではないが、反応終濃度として、ポリアニオンの場合には0.002-10重量%、2価金属塩を生成する物質の場合には0.01-5重量%となる範囲で用いるのが望ましい。

【0017】また、リボタンパク質を溶解しない界面活性剤（以下、「溶解阻害性活性剤」という）としては、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレン

アルキルエーテル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩等から選ばれる界面活性剤が挙げられる。

【0018】これらのうち、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとしては、ポリオキシエチレンセチルエーテル（市販品としてはエマルゲン220（花王社製）等）が；ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとしては、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル（市販品としてはエマルゲン913（花王社製）等）が；ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物としてはブルロニックF-88（旭電化社製）が；ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩としてはポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム（市販品としてはエマール20C（花王社製）等）が；アルキルベンゼンスルホン酸塩としてはドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムが好ましい。

【0019】これらの溶解阻害性活性剤は、1種又は2種以上を組み合わせて用いる事ができ、その使用量は特に限定されないが、試料と混合したときの濃度が0.01-5重量%、特に0.05-1重量%になるような範囲で用いるのが望ましい。

【0020】溶解促進性活性剤とコレステロール測定用酵素試薬（以下、「コレステロール試薬」という）を検体である血清へ添加するに際しては、それぞれを別途添加しても、また混合物として同時に添加してもよい。

また、反応阻害物質は、溶解促進性活性剤とコレステロール試薬のいずれかまたはこれらの混合物に添加して用いることができる。更に、複数の反応阻害物質を使用する場合は、混合して単独の場合と同様に用いられるほか、溶解促進性活性剤とコレステロール試薬にそれぞれ別に添加して用いてもよい。

【0021】本発明のコレステロールの測定のために用いるコレステロール試薬としては、公知の酵素試薬、例えばコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの組み合わせ、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールデヒドロゲナーゼの組み合わせ等が挙げられる。これらのうち、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの組み合わせが好ましい。

【0022】更に、これらのコレステロール試薬を添加した後、最終的にコレステロールの反応量を測定するため用いる方法は特に制限されず、例えばパーオキシダーゼと色原体をさらに組み合わせて行う吸光度分析、補酵素や過酸化水素を直接検出する方法等が挙げられる。

【0023】本発明方法においては、HDLのコレステロールが優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にその反応を検出する必要があるが、そのためには溶解促進性活性剤とコレステロール試薬と試料とを混合した後の、進行する反応を動力学的にモニターする方法や、HDLコレステロールの反応を反応終末点法で測定してブランク値にて補正する方法（2ポイント

法）等を用いることができる。また、HDLの反応をより長くモニターする必要がある場合には、反応阻害物質を添加し、コレステロールの検出反応を遅延させる事によって、HDLコレステロール濃度のみに依存する反応を延長させることができる。

【0024】本発明方法を有利に実施するために利用される試薬ないし試薬キットとしては、例えば次のものを挙げることができる。

（1）次の2成分（イ）および（ロ）を含有するもの。

（イ）溶解促進性活性剤

（ロ）コレステロール試薬

（2）次の成分（イ）～（ハ）。

（イ）溶解促進性活性剤

（ロ）反応阻害物質（結合性物質、溶解阻害性活性剤）

（ハ）コレステロール試薬

【0025】このような試薬や試薬キットには、前記の溶解促進性活性剤、コレステロール試薬（コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ等）、反応阻害物質（結合性物質、溶解阻害性活性剤）、パーオキシダーゼ、色原体、補酵素等の他、適当なpH緩衝剤、酸化防止剤、担体等を組み合わせることができる。また、試薬や試薬キットの形状としても、液体状のものその他、これを凍結乾燥したもの等が利用できる。

【0026】

【発明の効果】本発明によれば、遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率良くHDL中のコレステロールを定量する事ができる。また、少ない試料で、簡便な操作により、特異的な測定が可能であるため、種々の自動分析装置に適用でき、臨床検査の領域において極めて有用である。

【0027】

【実施例】次に、実施例を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明はこれに何ら制約されるものではない。

【0028】実施例 1

リポタンパク質を含む50例の血清検体について、以下の本発明方法及び従来の沈殿法により、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。本発明方法は、各血清検体3μlに、100mMのMES緩衝液（第一試薬；pH6.5）300μlを添加し、約5分後に、エマルゲンB-66 1%、コレステロールエステラーゼ 1U/ml、コレステロールオキシダーゼ 1U/ml、パーオキシダーゼ 5U/ml及びジスルフホブチルメタトライシン 0.04%、4-アミノアンチピリン 0.004%を含む100mMのMES緩衝液（pH6.5）からなるコレステロール測定試薬（第二試薬）100μlを加え、第二試薬直前と添加後5分後の600nm（副波長 700nm）における吸光度を測定し、その差より血清検体中のHDLコレステロー

ル濃度を求めた（2ポイント法）。また、較正用物質として濃度既知のコントロール血清を用いた。なお、以上の操作は、日立7150型自動分析装置を用いて行った。

【0029】一方、沈殿法によりHDL中のコレステロールを測定するには、デキストラント硫酸0.3%及び塩化マグネシウム2%を含む水溶液200μlを検体200μlと混和し、3000rpmで10分間遠心分離を行った。この上清50μlを採取し、TritonnX-100 1%、コレステロールエステラーゼ1U/ml、コレステロールオキシダーゼ1U/ml、パーオキシダーゼ5U/ml及びジスルフホブチルメタルイジン0.04%、4-アミノアンチピリン0.04%を含む100mMのMES緩衝液(pH6.5)からなるコレステロール測定試薬3mlと混合し、37℃で10分間インキュベートした後、600nmにおける吸光度を測定し、HDL中のコレステロール濃度を求めた。

【0030】本発明法と沈殿法による結果の相関図を図1に示すが、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈殿法と極めて良好な相関を示していた。

【0031】実施例2 第二試薬中のエマルゲンB-66の代わりにエマルゲンA-60 1%を添加した以外は実施例1と同一の試薬を用い、同一の方法でリボタンパク質を含む50例の血清検体について、HDL中のコレステロールを定量した。即ち、検体3μlに第一試薬300μlを添加し、約5分後、第二試薬100μlを加えた。第2試薬添加後、12秒後から24秒後までの546nm(副波長660nm)における吸光度変化を測定し、血清検体中のHDLコレステロール濃度を求めた。また、較正用物質としては濃度既知の2種類のコントロール血清(低濃度と高濃度)を使用した。なお、以上の操作

*

【表1】

*は、日立7150型自動分析装置を用いて行った。また、同じ検体について、従来の沈殿法で実施例1と同様に、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。この結果を図2に示す。

【0032】図2の結果から、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈殿法と良好な相関を示した。

【0033】実施例3

実施例2において用いたのと同一の第二試薬と、下記の第一試薬を用い、リボタンパク質を含む50例の血清検体について、本発明方法及び従来の沈殿法により、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。なお、第一試薬A(実施例2と同じ)は対照として加えた。

【0034】[第一試薬]

第一試薬A: 100mMのMES緩衝液(pH6.5)

第一試薬B: プロニックF-88(旭電化社製)0.2%水溶液

第一試薬C: リンタングステン酸ナトリウム0.2%及び塩化マグネシウム100mMを含む水溶液(pH6.4)

第一試薬D: プロニックF-88 0.2%、リンタングステン酸ナトリウム0.2%及び塩化マグネシウム100mMを含む水溶液(pH6.4)

【0035】吸光度の測定は、反応阻害物質の添加の効果を確認するため、日立7150を用いて第二試薬添加後12秒から24秒後、12秒後から168秒後及び12秒後から312秒後のそれぞれ異なる測光時間を用いて測定を行った。一方、沈殿法によるHDLの測定は実施例1と同様に行い、各条件での本発明方法との相関関係を調べた。この相関係数を表1に示す。

【0036】

	測定時間		
	12- 24秒	12- 168秒	12- 312秒
第一試薬A	0.922	0.488	0.336
第一試薬B	0.739	0.900	0.846
第一試薬C	0.543	0.946	0.747
第一試薬D	0.045	0.972	0.988

【0037】この結果に示されるように、反応阻害物質を含まない第一試薬では、反応初期の吸光度測定でのみ良好な結果を示した。一方、反応阻害物質を含むプロニックF-88(旭電化社製)0.2%水溶液、リンタングステン酸ナトリウム0.2%及び塩化マグネシウム

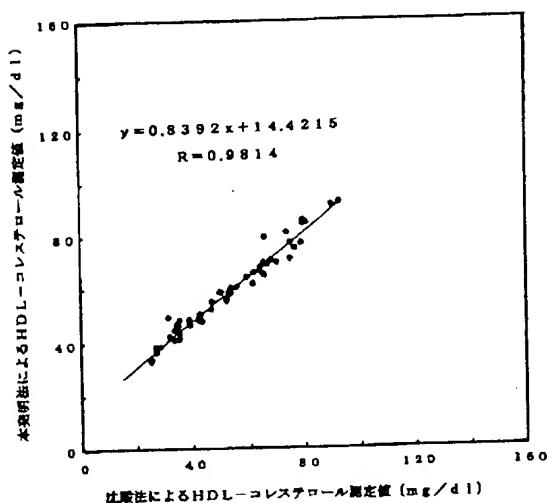
100mMを含む水溶液(pH6.4)並びにプロニックF-88 0.2%、リンタングステン酸ナトリウム0.2%及び塩化マグネシウム100mMを含む水溶液(pH6.4)をそれぞれ第一試薬として用いた測定結果では、長時間の測定でいずれも良好な相関(1に

近いほど相関性が高い)を示し、反応阻害物質が、HDLコレステロール量に依存する反応を延長する効果があることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1における本発明方法と沈殿法の分析値

【図1】



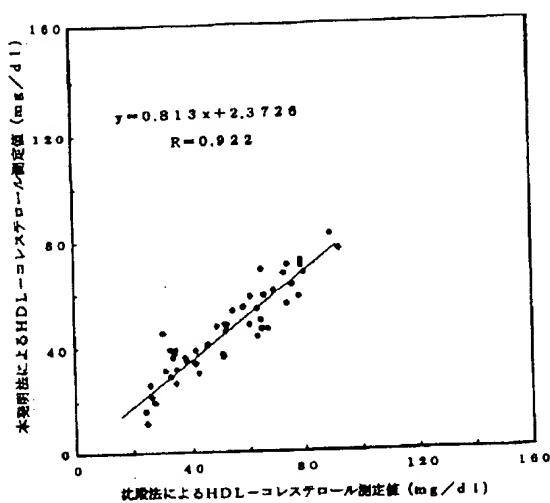
の相関関係を示す図面

【図2】実施例2における本発明方法と沈殿法の分析値

の相関関係を示す図面

以 上

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 真鍋 満久
茨城県竜ヶ崎市向陽台3-3-1 第一化
学薬品株式会社つくば開発研究所内